

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-122942

(43)Date of publication of application : 26.05.1988

(51)Int.Cl.

G01N 27/38
G01N 27/30
// C12Q 1/00

(21)Application number : 61-269189

(71)Applicant : KANZAKI PAPER MFG CO LTD

(22)Date of filing : 12.11.1986

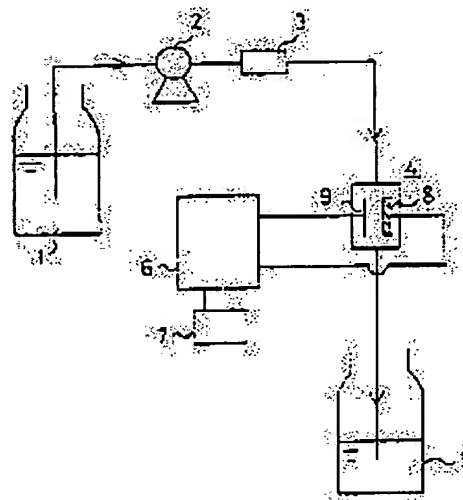
(72)Inventor : HAYASHI RYUZO
KARIGOME AKIO

(54) ACTIVATION OF ENZYME ELECTRODE

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable stable measurement, by performing a triangular wave potential scanning on an enzyme electrode after measurement to recover the enzyme electrode from a drop in the sensitivity.

CONSTITUTION: Given a measuring range, a fixed voltage is applied to a measuring electrode system 4 with a potentiostat 6 and current of the electrode system 4 is recorded to determine an object substance. With the repetition of such a measurement, a component with a relatively high molecular weight other than a substance to be measured contained in a sample adsorbs on the surface of an enzyme layer of an enzyme electrode 8 with a gradual permeation thereof while that with a relatively low molecular weight does on the surface of a conductor within the enzyme layer with a gradual permeation thereof, causing a drop in the sensitivity. To recover the sensitivity of the electrode 8, a triangular wave potential scanning is performed with a potential scan unit 7 attached to the potentiostat 6 within a stable area of water. Here, after the potential is scanned linearly in the positive direction from a fixed value of a measured density range, the scanning is reversed in the direction to cover down to the lower limit potential and the potential is returned to a fixed value in the original condition. This enables the stabilizing of the residual current quickly.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-54175

⑤Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑭⑭公告 平成4年(1992)8月28日
 G 01 N 27/38 7235-2J
 // C 12 Q 1/00 Z 6807-4B 3 5 3 Z
 7235-2J G 01 N 27/30 発明の数 1 (全4頁)

⑬発明の名称 酵素電極の活性化方法

⑮特 願 昭61-269189

⑯公 開 昭63-122942

⑰出 願 昭61(1986)11月12日

⑱昭63(1988)5月26日

⑲発 明 者 林 隆 造 兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎製紙株式会社神崎工場内

⑲発 明 者 刈 米 昭 夫 兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎製紙株式会社神崎工場内

⑲出 願 人 神崎製紙株式会社 東京都中央区銀座4丁目9番8号

⑲代 理 人 弁理士 蓮 見 勝
 審 査 官 嶋 矢 督

1

2

⑳特許請求の範囲

1 酸化還元酵素を導電体上に固定化した酵素電極を用い、測定目的物質を検出する測定方法において、測定後に該酵素電極に三角波電位走査を行うことを特徴とする酵素電極の活性化方法。

発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、固定化酵素電極（以下酵素電極と略す）を用いた測定方法に関し、特に反復測定により起こる酵素電極の感度低下を回復させる方法に関する。

〔従来の技術〕

酵素反応を生体物質や食品等に含まれる測定目的物質の定量に用いることは、その反応速度の速さ及び基質特異性を有する等の利点から広く行われている。特に酵素電極を用いた測定方法は、微量の酵素を反復利用する可能性を開き、その応用範囲を医療、食品、薬品分析等に広げつつある。

しかし、酵素電極は測定を繰り返すにつれ、その感度が徐々に低下する欠点がある。かかる感度低下をもたらす要因には、

(a) 固定化された酵素自体の変性及び失活。

(b) 試料中の不純物が固定化酵素層へ吸着することにより、測定目的物質が固定化酵素層に拡散

する過程が妨害される。

(c) 酵素電極の導電体表面の変質。

などがある。これらのうち(a)の要因については、酵素固定化技術そのものの改善が必要である。ただし、この要因による感度低下は強酸、強塩基試料等の測定を行わない限り比較的ゆるやかに進行することから、時々標準液で校正を行えば、測定誤差を実用上問題のない程度におさえることが可能である。一方、(b)(c)の要因の対策としては測定時に印加する電圧とは逆電圧を酵素電極に短時間印加する方法が提案されている（特開昭57-60255号、特開昭60-155959号）。しかし、急激に逆電圧を印加するこれらの方法では電極に大きな電流が流れ、白金等の導電体表面に損傷を起こす可能性があること、また電位の復帰に伴う残余電流の変動により測定が長時間にわたり困難になること、また白金等の上に酵素を固定化した酵素電極を作用極とし、酵素反応で生じた過酸化水素が酸化されるとき生ずる電流を検出する測定方法において、通常印加されている+0.6～+0.8V（対飽和カロメル電極、以下SCEと略す）と逆電圧（-0.6～-0.8V対SCE）を印加すると、水の安定領域を越え、酵素電極表面に水素の気泡が付着することによって以後の測定において電極の安定性が

阻害される欠点がある。ここで水の安定領域とは水分子の電気分解や緩衝液、支持電解質の酸化還元反応が起こらず、試料溶液中の測定目的物質を酵素電極に流れる電流より測定出来る領域のことである。

〔発明が解決しようとする問題点〕

かかる現状に鑑み本発明者等は、前述の問題を解消し、酸素電極の感度低下を効果的に回復させる方法に関し鋭意研究の結果、特に三角波電位走査を酵素電極に行うことにより、このような目的が達成せられることを見出し本発明を完成するに至った。

〔問題を解決するための手段〕

本発明は、酸化還元酵素を導電体上に固定化した酵素電極を用い、測定目的物質を検出する測定方法において、測定後に該酵素電極に三角波電位走査を行うことを特徴とする酵素電極の活性化方法である。

〔作用〕

図面に基いて更に具体的に説明する。第1図に本発明にかかるフロー型測定装置を示す。緩衝液リザーバー1中の緩衝液は、定流量ポンプ2で図中の矢印の方向へ送液される。測定試料は試料注入口3よりマイクロシリンジにより注入され、測定電極系4、排液リザーバー5へと導かれる、測定中はポテンシオスタット6により測定電極系4に一定電圧を印加し、測定電極系4の電流を記録することにより目的物質の定量を行う。このような測定を繰り返し行くと、試料に含まれる測定目的物質以外の比較的高分子量の成分、つまり蛋白質等は酵素電極8の酵素層表面に、また比較的低分子の成分、つまり低分子アミンや有機酸等は酵素層の内部にある白金等導電体表面に徐々に浸透して吸着し、あるいは白金等導電体が、徐々に酸化被膜等を形成し感度低下の原因となる。この現象は長期間使用した酵素電極に最終的な電極反応に関与する過酸化水素等を作用させた場合の応答の低下や、サイクリックボルタングラムのピークの歪、残余電流の上昇等により確認できる。

本発明の測定方法においては、このような反復測定により徐々に感度が低下した酵素電極に感度を回復させる目的でポテンシオスタット6に付設した直線電位走査ユニット7により三角波電位走査を行うことを特徴とするが、かかる電位走査は

水の安定領域内で行われ、その範囲は電極の材質、緩衝液、支持電解質の種類によつて最適範囲が異なる。中性付近の緩衝液中にあつては、酵素電極に用いる導電体がグラフアイト極である場合は-1.0~+1.5V、またはそれが金極である場合は-0.4~+1.5V、更にそれが白金極である場合には-0.5~+1.3V(いずれも対SCE)が好ましい範囲である。走査速度は、ほぼ0.1~1V/secで行う。かかる走査は必ずしも各測定終了毎に行う必要はないが、測定目的物質以外の蛋白質等を多く含む試料の場合では試料注入10数回毎に行う必要がある。三角波走査を行う場合の方法としては、特に電位を濃度測定中の一定値から正方向に直線的に走査した後、走査方向を逆転して下限電位まで走査し、元の測定状態の一定電位へ戻すと(第2図)、残余電流を速やかに安定させることが出来るため特に好ましい。三角波電位走査を10秒~10分間くり返すことにより、静電的に吸着した成分は、反発力を受けて流去せられ、また白金等導電体表面の酸化被膜等が除去される結果、酵素電極の感度を良好な状態にもどし、その寿命を延ばす効果が得られる。本発明においては、三角波電位走査を行うため白金等の導電体表面の損傷が起こらず、さらに残余電流値が速やかに安定するため直ちに測定を行え、しかも走査後の感度が効果的に初期の値に復する。

第1図に示す測定電極系4は白金等導電体に酵素を固定した酵素電極8と白金等の対極9で構成されるが、参照電極を加えた3電極系を用いても良い。また本発明は酵素電極がフロー型測定装置に組込まれた場合のみならず勿論バッチ型測定装置の場合にも同様に応用出来る。

〔実施例〕

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

第1図に示す測定装置において酵素電極として白金線の上にグルコースオキシダーゼType II (シグマ社製)とウシ血清アルブミンの1:1混合物をグルタルアルデヒドで固定化したものを用いた。対極としては白金線を用い、 H_2O_2 を検出することによりグルコースの定量を行つた。

まず、緩衝液としてpH7.0の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液を1.0ml/minで流し、測定電極系に

5

6

+0.6Vの電圧を印加した。最初に10mMグルコース水溶液を20 μ l注入し、そのときに得られた電流値を初期値として記録した。試料として缶ジュースを用い1分おきに試料を注入し、電流値を計測した。そして50回に1回10mMグルコース水溶液を20 μ l注入し、その時点の電流値を初期値と比較した。100回注入した後、-0.5~+1.3Vの範囲を1V/secで10分間三角波電位走査を行い10mMグルコース水溶液20 μ lを注入し、相対感度を調べた。100回注入毎にこの操作を行い、計500回まで注入した。第3図に示す如く、試料注入により起きる感度の低下は100回注入毎に行われた三角波電位走査により回復し、500回目においても初期感度のレベルを保つことがわかった。

比較例 1

三角波電位走査を行わなかった以外は実施例1と同様に測定した。この場合、100回目には初期値と比べて相対感度96%になり、500回目には84%まで低下した(第3図)。

比較例 2

三角波電位走査を行わず、100回試料を注入後、

酵素電極に-0.6Vを30秒間印加した以外は実施例1と同様に測定した。

-0.6Vを30秒間印加した結果、酵素電極表面に気泡が発生し相対感度は初期値の60%まで低下した。

〔効果〕

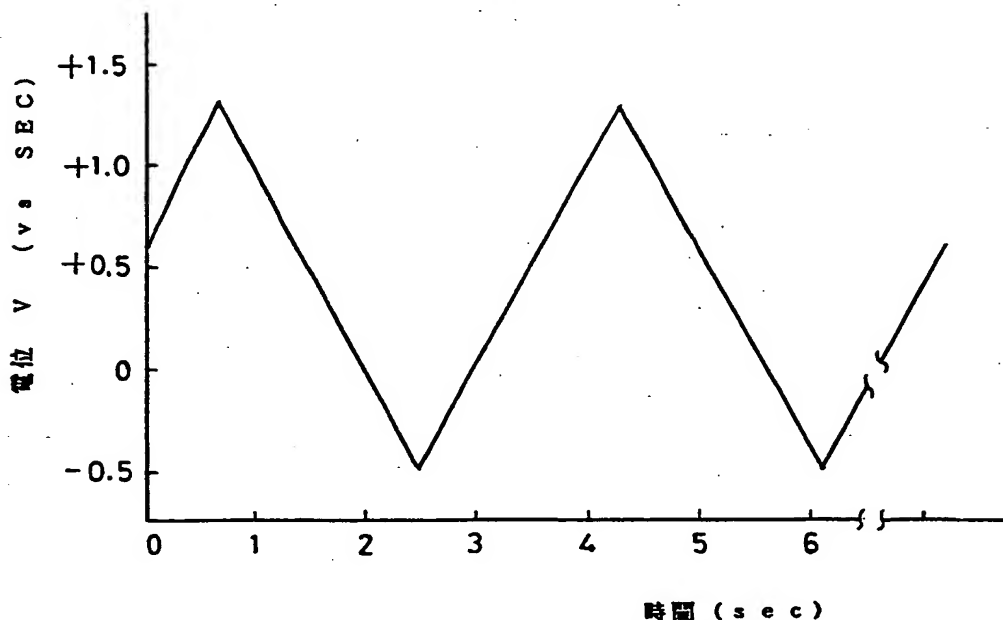
第3図に示す如く、本発明では三角波電位走査を行うことにより酵素電極の感度低下を効果的に回復させることが出来、安定した測定が可能となる。またかかる走査により酵素電極の寿命を長くすることができる。

図面の簡単な説明

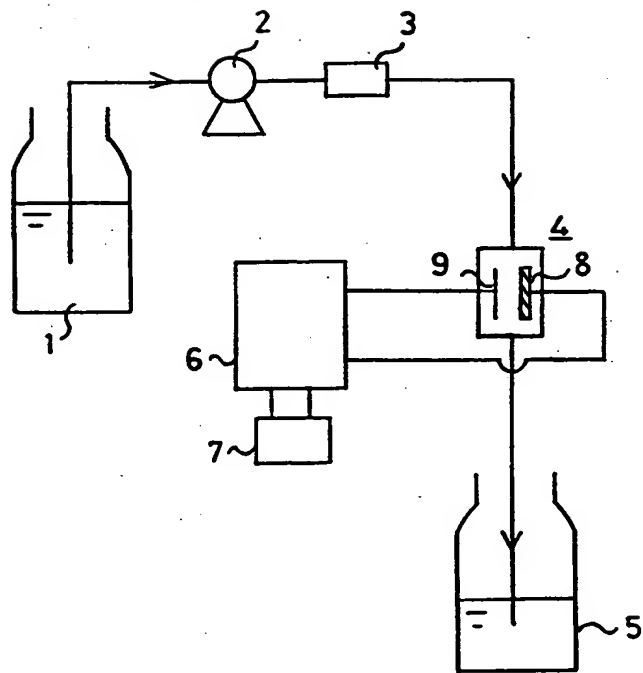
第1図は本発明にかかる酵素電極活性化方法の実施例を示す。第2図は本発明で酵素電極に行う三角波電位走査の例を示し、第3図は実施例1、比較例1における測定結果を示す。

1……緩衝液リザーバー、2……定流量ポンプ、3……試料注入口、4……測定電極系、5……排液リザーバー、6……ポテンシオスタット、7……電位走査ユニット、8……酵素電極、9……対極。

第2図



第1図



第3図

